

OS FENOIS VOLÁTEIS E OS SEUS PRECURSORES EM SOLUÇÕES MODELO E EM VINHO

Maria João CABRITA¹; Raquel PATÃO²; Ana Maria COSTA FREITAS¹

RESUMO

A produção de fenóis voláteis tem causado grande preocupação na indústria vitivinícola por ser responsável pela introdução de aromas desagradáveis que afectam a qualidade dos vinhos. Os etilfenóis, resultantes da degradação dos ácidos hidroxicinâmicos devido à actividade microbiana, conferem aos vinhos um aroma a estrebaria quando presentes em concentrações elevadas.

Este trabalho teve como principal objectivo avaliar a influência das leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera* na degradação dos ácidos hidroxicinâmicos, tentando correlacioná-la com a taxa de formação dos etilfenóis.

A composição de ácidos fenólicos e de fenóis voláteis num meio sintético e em vinhos tintos inoculados com leveduras deste género foi determinada por HPLC-DAD e GC-FID, respectivamente. Através destes métodos analíticos foi possível identificar e quantificar os ácidos cafeico, *p*-cumárico e ferúlico e os etilfenóis 4-etilcatecol, 4-etilfenol e 4-etilguaiaicol ao longo do tempo. Os resultados obtidos permitiram concluir que as leveduras *D. bruxellensis* podem ser consideradas leveduras contaminantes muito importantes, dada a sua capacidade de produzirem quantidades elevadas de etilfenóis que são responsáveis pela deterioração do vinho.

PALAVRAS CHAVE: fenóis voláteis, 4-etilcatecol

1 - INTRODUÇÃO

A presença de fenóis voláteis em vinhos tintos pode ser uma preocupação para a indústria vitivinícola, sendo considerada actualmente um ponto fundamental do controlo de qualidade dos vinhos. Os fenóis voláteis, vinil-fenóis e etil-fenóis, podem ser produzidos através da actividade microbiológica, de forma sequencial, dando origem a aromas estranhos, facilmente identificáveis em vinhos. A qualidade dos vinhos pode ser afectada pela presença de 4-etilfenol e 4-etilguaiaicol, os dois principais fenóis voláteis, cuja presença origina aromas descritos como estrebaria, suor a cavalo e medicinal.

Embora a origem dos fenóis voláteis em vinhos tenha estado em discussão durante muito tempo, parece hoje indiscutível que a sua origem está relacionada com a degradação dos

¹ Departamento de Fitotecnia, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), Ap 94 7002-554 Évora, Portugal. Email: mjbc@uevora.pt; afreitas@uevora.pt

² Aluna do Mestrado de Engenharia Química e Química Aplicada da Universidade Técnica de Lisboa

ácidos hidroxicinâmicos e dos seus correspondentes esteres, por acção de leveduras de contaminação do género *Brettanomyces/Dekkera* (LOUREIRO *et al.*, 2006).

Muitos trabalhos descrevem a presença de 4-etilfenol e 4-etilguaiaicol em vinhos (PIZARRO *et al.*, 2007; VALENTÃO *et al.*, 2007), mas a presença do 4-etilcatecol havia sido referida apenas uma vez (HESFORD *et al.*, 2004) até que CARRILLO e TENA (2007) demonstraram a sua presença em vinhos contaminados com leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera*.

O principal objectivo deste trabalho foi avaliar a transformação dos ácidos hidroxicinâmicos e a consequente formação de fenóis voláteis, por uma levedura do género *Brettanomyces/Dekkera*, em meio sintético e em vinho, com particular ênfase para o 4-etilcatecol, utilizando métodos de preparação de amostra muito simples, baseados em extracções líquido-líquido.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Material

2.1.1. Meio sintético

As estirpes de leveduras *Dekkera bruxellensis* 1791 cedidas pelo ISA (Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal) foram isoladas de um vinho tinto contaminado e mantidas num meio GYPC [50 g/L de glucose (Merck, Darmstadt, Alemanha), 3 g/L de extracto de leveduras (Difco Laboratories, Detroit, USA), 5 g/L de peptona e 20 g/L de agar a pH 6,0 e 5 g/L de carbonato de cálcio (Merck)] a 4 °C.

Para o crescimento das leveduras, foi utilizado um meio sintético [6,7 g/L YNB (Difco)] adicionado de 2% de glucose (p/v) e 10% (v/v) de etanol a 99,8%, com pH final de 5,5.

O meio sintético foi filtrado (através de membranas esterilizadas de 0,22 µm) e agitado a 120 rpm a 25 °C. A concentração de biomassa foi medida diariamente através da densidade óptica a 640 nm. Quando a biomassa atingiu o valor $DO_{640\text{ nm}} = 1$, o meio foi dividido em 9 frascos de vidro de 500 ml (amostras B1 a B9) de modo a obter uma concentração de 10^4 células/ml em cada um. Às amostras B1, B2 e B3 adicionaram-se 5 mg de ácido caféico, às amostras B4, B5 e B6 foram adicionadas 5 mg de ácido *p*-cumárico e às amostras B7, B8 e B9 adicionaram-se 5 mg de ácido ferúlico. Todas as amostras foram mantidas na estufa a 23 °C durante 8 dias. As mesmas amostras foram analisadas simultaneamente, de 2 em 2 dias, por HPLC-DAD e GC-FID para determinação da evolução da concentração dos ácidos fenólicos e dos etilfenóis, respectivamente.

2.1.2. Vinho

Um vinho tinto de 2007 ainda sem a fermentação maloláctica realizada, foi dividido em duas partes: uma parte C que funcionou como controlo, e uma parte Y que se inoculou com a levedura *Dekkera bruxellensis* 1791. A metade de C e a metade de Y adicionaram-se 15 mg/L de cada um dos três ácidos fenólicos (C+A e Y+A). Os vinhos foram mantidos a 25°C e colheram-se amostras após um e dois meses. O ensaio foi realizado em triplicado.

2.2 – Análise por HPLC

2.2.1. Preparação das amostras

Amostras de 5 mL, com pH ajustado a 2, foram extraídas em duplicado com 5 mL de éter etílico durante 10 minutos, com agitação. Após cada extracção, as amostras foram decantadas e as fracções orgânicas combinadas, secas sob sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas à secura num fluxo suave de azoto. O resíduo obtido foi redissolvido em 1 mL de solução metanol/água (1:1) e filtrado através de um filtro de 0,45 µm antes de serem analisados por HPLC-DAD.

2.2.2. Condições cromatográficas

Para a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizou-se um cromatógrafo de fase líquida da Hewlett Packard série 1050 equipado com um loop de 20 µl, uma bomba quaternária e um detector de fotodíodos (DAD) da HP série 1100.

A coluna utilizada para a separação dos compostos fenólicos foi uma RP Superpher® 100, C18 (250 mm × 4,6 mm i.d., 5 µm) (Merck, Alemanha) com précoluna do mesmo material. Os eluentes utilizados foram: solvente A - água/ácido acético (98:2 v/v) e solvente B água/metanol/ácido acético (68:30:2 v/v), com um fluxo de 1 mL/min, de acordo com o seguinte gradiente para o solvente A: de 95% a 70% (12 min); de 70% a 45% (15 min); de 45% a 23% (6 min); isocrático durante 9 minutos; de 23% a 5% (5 min); de 5% a 0% (3 min); isocrático durante 5 minutos. A detecção dos compostos foi feita a 320 nm.

2.2.3. Rectas de calibração

Tabela 1 – Parâmetros de calibração para os ácidos fenólicos

Composto	TR± DP (minutos)	Equação	r ²
Ácido cafeíco	27,20±0,98	Y=391,03 X -167,74	0,9993
Ácido <i>p</i> -cumárico	37,68±1,05	Y = 521,08 X -107,10	0,9999
Ácido ferulico	43,94±1,40	Y = 421,86 X - 276,27	0,9986

TR ± DP tempo de retenção ± desvio padrão (n=3); r² coeficiente de correlação.

As rectas de calibração foram obtidas por injeções em triplicado de seis soluções padrão com diferentes concentrações (tabela 1) preparadas a partir de uma solução mãe contendo ácido cafeíco, ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico em etanol a 12% (v/v).

2.3 – Análises por GC-FID

2.3.1. Preparação das amostras

Adicionaram-se 200 µL de uma solução de 800 mg/L de 3,4-dimetilfenol (padrão interno) a amostras de 10 mL. Cada amostra foi extraída em duplicado com 5 mL de solução éter dietílico/pentano (1:1) durante 10 minutos, com agitação. Após cada extração as amostras foram decantadas e as fracções orgânicas foram combinadas, secas sob sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas até ao volume de 0,5 mL sob fluxo suave de azoto. O resíduo obtido foi analisado por GC-FID.

2.3.2. Condições cromatográficas

Na cromatografia em fase gasosa utilizou-se um cromatógrafo da Hewlett Packard série 6890 com as seguintes características: coluna RTX-Wax da Resteck (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm), injector no modo splitless a 230 °C e detector de ionização de chama (FID) a 250 °C. Usou-se hélio como gás de arraste com um fluxo de 1,4 mL/min. O forno estava a 80°C, aumentando até 140°C a 10°C/min, até 155°C a 5°C/min, até 200°C a 10°C/min (2 minutos) e finalmente até 220°C a 20°C/min.

2.3.3. Rectas de calibração

O padrão interno foi preparado em etanol a 75% (v/v). Foi preparada uma solução mãe contendo 80 mg/L de 4-etilcatecol, 80 mg/L de 4-etilguaiaicol e 50 mg/L de 4 etilfenol em etanol a 75%. Soluções de trabalho foram obtidas diluindo a solução mãe com uma solução modelo (4 g/L ácido tartárico; 3 g/L ácido málico; 0,1 g/L ácido acético; 0,025 g/L sulfato de magnésio; 0,1 g/L sulfato de potássio e 90 g/L etanol; pH = 3,30). Cada solução padrão foi extraída e injectada três vezes. Os parâmetros de calibração encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros de calibração dos fenóis voláteis

Composto	TR± DP (minutos)	Equação	r ²
4-etilguaiaicol	6,68±0,01	Y=0,0504x+0,0054	0,9993
4-etilfenol	8,01±0,01	Y=0,0611x-0,0083	0,9999
4-etilcatecol	14,67±0,05	Y=0,0376x-0,0004	0,9993

TR ± DP tempo de retenção ± desvio padrão (n=3); r² coeficiente de correlação.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

As figuras 1, 2 e 3 apresentam a evolução das concentrações dos ácidos fenólicos e dos etilfenóis ao longo do tempo, após a inoculação de leveduras *Dekkera bruxellensis*. Os resultados obtidos mostram que a diminuição da concentração dos ácidos fenólicos é acompanhada por um aumento da concentração dos fenóis voláteis.

Tanto o 4-etilfenol como o 4-etilguaiacol foram detectados em todas as amostras analisadas a partir do 2º dia após a inoculação das leveduras. As suas concentrações atingiram os 7,69 e os 7,25 mg/L, respectivamente, ao fim de apenas 8 dias, enquanto que os teores dos seus precursores diminuíram para apenas 0,28 e 0,77 mg/L.

O 4-etilcatecol, devido aos grupos diol vicinais que possui, é conhecido por ser termicamente lábil às temperaturas requeridas para a análise cromatográfica e por interagir com as fases líquidas e suporte inerte das colunas disponíveis comercialmente. Até à data, a sua detecção e quantificação por GC têm sido descritas na literatura apenas após derivatização (LARCHER *et al*, 2008). O aparecimento do 4-etilcatecol foi mais demorado do que o dos outros etilfenóis mas ao 4º dia após a inoculação das leveduras foi possível a sua detecção sem recorrer a qualquer derivatização prévia. A concentração deste composto atingiu os 1,24 mg/L ao 8º dia após a inoculação, enquanto que a concentração do seu precursor (ácido cafeico) diminuiu para 5,51 mg/L.

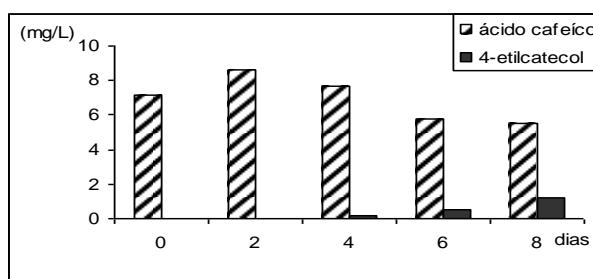


Figura 1 - Representação gráfica da variação da concentração do ácido cafeico e do 4-etilcatecol em meio sintético ao longo do tempo

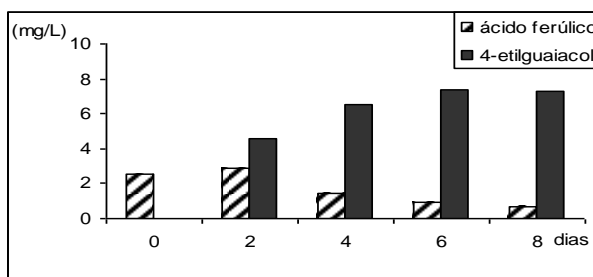


Figura 2 - Representação gráfica da variação da concentração do ácido *p*-cumárico e do 4-etilfenol em meio sintético ao longo do tempo

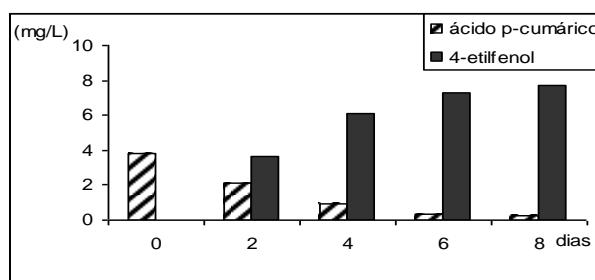


Figura 3 - Representação gráfica da variação da concentração do ácido ferúlico e do 4-etilguaiaicol em meio sintético ao longo do tempo

A tabela 3 apresenta a taxa de conversão dos ácidos hidroxicinâmicos em fenóis voláteis. Esta foi calculada através da razão entre a concentração máxima de etilfenóis obtida e a concentração teórica produzida por 10 mg de ácidos hidroxicinâmicos.

Obtiveram-se taxas elevadas (superiores a 90%) para a conversão do ácido *p*-cumárico em 4-etilfenol e do ácido ferúlico em 4-etilguaiaicol mas a conversão do ácido cafeico em 4-etilcatecol foi reduzida (inferior a 20%). Os valores obtidos justificam o facto dos compostos 4-etilfenol e 4-etilguaiaicol serem bem conhecidos pelos enólogos, enquanto que a presença do 4-etilcatecol em vinhos foi referida pela primeira vez há pouco tempo (HESFORD *et al*, 2004)

Estes resultados parecem indicar que, apesar da abundância do ácido cafeico nos vinhos e da sua semelhança estrutural com a dos outros ácidos hidroxicinâmicos, as leveduras possuem maior afinidade para a conversão dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico nos etilfenóis correspondentes.

Na análise dos ácidos hidroxicinâmicos cafeico, *p*-cumárico e ferúlico verificou-se uma diferença entre a concentração inicial (10 mg/L) e a concentração detectada por HPLC logo após a inoculação das leveduras. Resultados similares foram anteriormente descritos por vários autores (MEDAWAR, 2003; SALAMEH *et al.*, 2008).

Tabela 3 – taxa de conversão dos ácidos hidroxicinâmicos em fenóis voláteis em meio sintético

Compostos	Concentração obtida (mgL ⁻¹)	Concentração teórica (mgL ⁻¹)	Taxa de conversão (%)
4-etilguaiaicol	7,25 ± 0,53	7,84	92,47
4-etilfenol	7,69 ± 0,36	7,44	103,36
4-etilcatecol	1,24 ± 0,34	7,66	16,19

Nas amostras de vinho inoculadas com *D. bruxellensis* e, principalmente, naquelas às quais se adicionaram os três ácidos hidroxicinâmicos, ocorreu uma diminuição significativa do teor dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico ao longo do tempo, acompanhada pelo aumento da concentração dos etilfenóis correspondentes.

Ao fim de um mês após a inoculação das leveduras detectaram-se concentrações de ácidos hidroxicinâmicos próximas das adicionadas ao vinho (15 mg/L) e o único etilfenol detectado foi o 4-EG. Apesar da degradação destes compostos ocorrer bastante mais lentamente do que em meio sintético, ao fim de dois meses verificou-se uma diminuição da concentração dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico para cerca de metade e detectou-se a presença dos três etilfenóis no vinho, sendo o 4-etilguaiaicol o mais abundante (8,34 mg/L).

Tabela 4 – Ácidos fenólicos e fenóis voláteis (mg L⁻¹) nas amostras de vinho inoculado

	amostra	Ácido caféico	Ácido <i>p</i> - cumárico	Ácido ferulico	4-etil guaiaicol	4-etil fenol	4-etil catecol
1º mês	C	4,15±0,07	2,44±0,11	0,87±0,05	1,28±0,04	nd	nd
	C+A	15,39±0,28	13,23±0,27	12,79±1,18	1,10±0,06	nd	nd
	Y	4,98±0,28	2,95±0,07	0,99±0,01	0,90±0,34	nd	nd
	Y+A	18,21±0,36	15,31±0,24	16,86±0,39	4,16±0,00	nd	nd
2º mês	C	5,42±0,55	3,08±0,27	1,01±0,08	0,84±0,47	nd	0,07±0,00
	C+A	17,41±1,46	14,59±1,47	15,30±0,22	0,80±0,14	0,18±0,00	0,04±0,01
	Y	4,72±0,22	1,44±0,08	0,87±0,02	1,26±0,14	0,47±0,00	0,24±0,00
	Y+A	20,17±1,36	8,00±1,03	6,90±0,98	8,34±0,31	3,97±0,17	0,33±0,00

C –controlo, Y – leveduras; A - ácidos

4 – CONCLUSÕES

A bioconversão dos ácidos hidroxicinâmicos em fenóis voláteis por leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera*, continua a ser um problema na enologia moderna. Os resultados obtidos nestes ensaios mostram que as leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera* são capazes de produzir 4-etilfenol a partir de ácido *p*-coumárico, 4-etilguaiaicol a partir do ácido ferúlico e ainda 4-etilcatecol a partir do ácido caféico. Sendo o ácido caféico geralmente o mais abundante ácido hidroxicinâmico nos vinhos, não só o 4-etilcatecol é o fenol volátil que aparece em menor concentração, como é aquele que mais tempo leva a aparecer, em igualdade de outros factores.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LOUREIRO, V., MALFEITO-FERREIRA, M., 2006, Food Spoilage Microorganisms. Blackburn, C. (Ed.), Chap 13. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 354–398.
- PIZARRO, C.; PÉREZ-DEL-NOTARIO, N.; GONZÁLEZ-SÁIZ, J.M., 2007, Determination of Brett character responsible compounds in wines by using multiple headspace solid-phase microextraction. *J. Chromatogr A*, 1143, 176–181.
- VALENTÃO P.; SEABRA, R.M.; LOPES, G.; SILVA, L.R.; MARTINS, V.; TRUJILLO, M.E.; VELÁZQUEZ, E.; ANDRADE, P.B., 2007, Influence of *Dekkera bruxellensis* on the contents of anthocyanins, organic acids and volatile phenols of Dão red wine. *Food Chemistry*, 100, 64–70
- HESFORD, F., SCHNEIDER, K.; PORRET, N.; GAFNER, J., 2004. Identification and analysis of 4-ethylcatechol in wines tainted by *Brettanomyces*. ASEV 55th annual meeting, San Diego.
- CARRILLO, J.D.; TENA, M.T., 2007. Determination of ethylphenols in wine by *in situ* derivatisation and headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 387, 2547-2558.
- LARCHER, R.; NICOLINI, G.; BERTOLDI D.; NARDIN, T.; 2008, Determination of 4-ethylcatechol in wine by high-performance liquid chromatography-coulometric electrochemical array detection, *Analytica Chimica Acta*, 609, 235-240.
- MEDAWAR, W.; 2003, Etude physiologique et cinétique des levures du genre *Brettanomyces* dans un contexte oenologique. Institute polytechnique de Toulouse et Université Saint Joseph de Beyrouth.
- SALAMEH, D.; BRANDAM, C.; MEDAWAR, W.; LTEIF, R.; STREHAIANO, P.; 2008, Highlight on the problems generated by p-coumaric acid analysis in wine fermentations, *Food Chemistry*, 107, 1661-1667.